

ENZYME SENSOR

Publication number: JP62144062

Publication date: 1987-06-27

Inventor: KARUBE MASAO; KUBO IZUMI

Applicant: FUJI ELECTRIC CO LTD

Classification:

- International: **G01N27/414; G01N27/30; G01N27/403; G01N27/30;**
(IPC1-7): G01N27/30

- European:

Application number: JP19850285308 19851218

Priority number(s): JP19850285308 19851218

Report a data error here

Abstract of JP62144062

PURPOSE:To suppress the permeation of cation other than ammonia without use of a reference electrode, by providing an ammonia selectively permeating film between an Si_3N_4 film covered with an ion sensitive FET and an enzyme immobilized membrane. **CONSTITUTION:**A hydrophobic Si_3N_4 protective film 8 is formed on an SiO_2 film 7 covering a gate section 6 of an ion sensitive FET 10. A sample aqueous solution immersed portion of the film 8 is provided with an ammonia selectively permeating film 20 comprising a polymer such as poly-gamma-trichloro ethyl glutamate and an non-actin having ammonia selective permeating property. An enzyme immobilized membrane 30 is applied covering the film 20. With such an arrangement, $\text{H}^{<+>}$, $\text{Na}^{<+>}$, $\text{K}^{<+>}$ and the like in the sample aqueous solution is suppressed in the permeation with the membrane 20 and ammonia which was generated from an enzyme reaction with the membrane 30 permeates selectively to change the gate potential. This can eliminate any reference electrode thereby simplyfying the equipment.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑤ 日本国特許庁(JP)

⑥ 特許出願公開

⑦ 公開特許公報(A) 昭62-144062

⑧ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑨ 公開 昭和62年(1987)6月27日

G 01 N 27/30

J-7363-2G

F-7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑩ 発明の名称 酵素センサー

⑪ 特 願 昭60-285308

⑫ 出 願 昭60(1985)12月18日

⑬ 発 明 者 梶 部 征 夫 立川市富士見町4-11-8

⑭ 発 明 者 久 保 い づ る 川崎市川崎区田辺新田1番1号 富士電機株式会社内

⑮ 出 願 人 富士電機株式会社 川崎市川崎区田辺新田1番1号

⑯ 代 理 人 弁理士 山 口 隆

明 細 書

1. 発明の名称 酵素センサー

2. 特許請求の範囲

1) ゲート部を含む素子の表面部分が疎水性を有する窒化珪素保護膜により覆われたイオン感受性電界効果型トランジスタと、このイオン感受性電界効果型トランジスタの窒化珪素保護膜の供試水溶液接触部分を覆うよう設置されたアンモニア選択透過性膜と、このアンモニア選択透過性膜を覆うよう設置された酵素固定化膜とを備えたことを特徴とする酵素センサー。

2) 特許請求の範囲第1項記載のものにおいて、アンモニア選択透過性膜が膜を形成するポリマーとアンモニア選択透過性を有するノナクチンとからなることを特徴とする酵素センサー。

3) 特許請求の範囲第1項記載のものにおいて、ポリマーがポリマーエトリクロロエチルグルタマートであることを特徴とする酵素センサー。

3. 発明の詳細な説明

【発明の属する技術分野】

本発明は、イオン感受性電界効果型トランジスタ(以下:ISFETと略称する)を用いた酵素センサー、ことに供試水溶液中の底物の定量に使用される酵素センサーに関する。

【従来技術とその問題点】

ISFETを信号変換部を利用したバイオセンサーとしては、1980年にJ. Janata らによって発明されたペニシリンを測定するためのペニシリンセンサーをはじめとして、尿酸センサー、グルコースセンサーなどが知られている。これらはいずれもISFETの表面に形成された分子識別部である酵素固定化膜で有機物が分解されることによって生じるpH変化を、信号変換部であるISFETで電極信号に変換して測定する方式のものであり、センサーを小形かつ高感度化できる利点がある。しかしながら、この種のセンサーにおいては供試水溶液中に酵素反応以外の原因でH⁺、K⁺等のカチオンなどのイオン濃度変化やpHの変化があると、測定に誤差を生ずるという問題があり、この影響を排除するためにISFET

特開昭62-144062(2)

等からなる参照電極を供試水溶液中に設けて酵素反応以外の原因で生ずる電位変化を検知し、この参照電極の出力信号をISFETの出力信号から差し引くことにより上記差要因を排除するなどの対策が必要であり、ISFETを余分に必要とするばかりか両信号の差信号を求めるための信号処理回路を必要とするために、装置の複雑化ならびに経済的不利益をもたらす欠点があった。

【発明の目的】

本発明は前述の状況に鑑みてなされたもので、参照電極を用いることなくアンモニア以外のカチオンの影響を排除することができ、したがって供試水溶液中の尿酸の測定精度が高く、簡便化されて安価な酵素センサーを提供しようとするものである。

【発明の要旨】

本発明は、ゲート部を含むFETの表面を酸化珪素(SiO₂)絶縁膜および窒化珪素(Si₃N₄)保護膜で被覆して耐水性を保持したISFETの表面を、膜を形成するポリマーとアンモニア選択透過

能を有する抗生物質ノナクチンからなるアンモニア選択透過性膜、ならびにこのアンモニア選択透過性膜の外側に形成された酵素反応の基質または生成物にアンモニアが関与する性質を有する酵素を固定化した酵素固定化膜で二重に被覆するよう構成した。アンモニア選択透過性膜中のノナクチンは、生体中では空体膜に結合して1価カチオンの透過を選択的に行なうイオノフォアであり、カチオンに対する親和性は $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ \gg \text{Na}^+$ で特にアンモニアをよく透過させる。したがって、供試水溶液中の H^+ 、 Na^+ 、 K^+ などのカチオンはアンモニア選択透過性膜によりその透過が阻止され、これらのカチオンに基づくISFETのゲート電位の变化を阻止できるとともに、酵素反応により生じたアンモニアを選択的に透過することにより、供試水溶液中のアンモニア濃度によるゲート電位の变化をドレーン電流の変化として感度よく測定することができる。

【発明の実施例】

以下本発明を実施例に基づいて説明する。

第1図は本発明の実施例を示す酵素センサーの断面図である。図において、10はイオン感受性電界効果型トランジスタ(ISFET)であり、1はP-Si基板、2はソース電極、3はドレーン電極、4はノド接続領域、5はPチャネルストップ、6は金属電極が排除されたゲート部、7はゲート部6を含むFET表面を覆うよう形成されたSiO₂絶縁膜、8はSiO₂絶縁膜の外側に形成された窒化珪素(Si₃N₄)保護膜であり、供試水溶液中に浸漬される部分を窒化珪素保護膜8で覆うことにより、ISFETの耐水塩析性を保持することができる。

20はアンモニア選択透過性膜であり、膜を形成するポリマーと、アンモニア選択透過能を有する抗生物質ノナクチンからなる。ノナクチンは放線菌が多く生産しており、同菌から公知の方法で抽出精製して用いることもできるが、ストレプトマイセス・グリセウス社製の市販品を用いてもよい。アンモニア選択透過性膜を形成するポリマーとしては、該ポリマーから形成される膜がプロトン

透過させず、かつノナクチンの良溶媒であるチトラヒドロフラン(THF)に易溶である必要がある。このような条件を満たすポリマーとしてポリノチルグルタノート誘導体、ポリ塩化ビニリデン、アセチルセルローズ及びその誘導体などがある。これらのポリマーとノナクチンを有機溶媒に溶解させてポリマードープを得、このポリマードープから薄膜を形成させる。ISFETの表面に薄膜を形成するには、ディップコーティング法による。ISFETはポリマーとの接着性を良くするため適当な表面処理を施して用いてもよい。処理の有無にかかわらず、ISFETを適当な硬度のポリマードープに浸漬し、引き上げた後適当な方法で乾燥させて薄膜を形成させる。この際、ISFETのゲート部分だけでなく、使用時に供試水溶液に挿入される部分が完全に被覆されるようにアンモニア選択透過性膜20を形成させる。

30は、アンモニア選択透過性膜20の上に形成された酵素固定化膜であり、固定化する酵素は、酵素反応の基質または生成物にアンモニアが関与す

特開昭62-144062 (3)

るものであればセンサーとして有効である。このような酵素としては、例えばウレアーゼ、クレアチンディミナーゼ、グルタミン酸オキシダーゼなどがある。酵素の固定化は公知の方法でかつ薄膜を形成できる方法であればどのような方法でもよい。例えば、ポリビニルアルコールやK-カラゲーナン、アガロースゲルなどによる包埋固定化法、アルブミン、キトサンなどを担体とする担体架橋法、またはこれらの複合体により、酵素を固定化できる。酵素固定化膜30で1SFBET10のゲート部6を含む先端部を部分的または全体的に被覆することによって、酵素センサーが得られる。

実施例1

CVD法により窒化炭素保護膜8が形成された1SFBET10の表面を、γ-アミノプロピルトリエチンラン(γ-APTES)を80℃、0.5atmの条件下で2時間蒸着し、100℃2分間加熱処理する表面処理を行なった後、ポリ-γ-メチル-ε-グルタマートの誘導体であるポリ-γ-トリクロロエチルグルタマートをポリマーとするア

ンモニア選択透過性膜20を形成した。ポリ-γ-トリクロロエチルグルタマートは、ポリ-γ-メチル-ε-グルタマートのメチル基をβ-クロロトリクロロエタノールでエステル交換し、交換率70%となったものを用いた。該ポリマー100mg及びストレプトマイセス・グリセウス株製のノナクチン2mgをトリクロロフラン(TCF)1mlに溶解してポリマードープを得た。上記の方法でγ-APTES処理した1SFBETをこのポリマードープに浸漬した後、ゆっくりと引き上げてディップし、10mmHgの圧力下、真空で乾燥し、アンモニア選択透過性膜20を調製した。また酵素固定化膜30としては、牛血清アルブミン15mg及びウレアーゼ10mgを0.01M、pH7.0のリン酸緩衝液1mlに溶解させ、グルタルアルデヒド(GA)を1%になるように添加して攪拌した後、ただちにアンモニア選択透過性膜20が形成された1SFBETをこの液にディップコーティングし、デシケーター中、5℃で乾燥させるという方法で形成され、さらに0.01M、Tris-HCl、pH7.0の緩衝液中で十分浸漬

することにより、第1図に示すような尿素測定用の酵素センサーを得た。

第2図は前述の実施例になる酵素センサーの尿素に対する応答特性線図であり、図中横軸は尿素($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)を含む試料液を30℃に保たれた酵素センサー容器に注入する前後の時間を、縦軸は1SFBETのドレーン電流の変化をゲート部6のゲート電位に換算して示したものである。図において、試料液注入時点($t=0$)以前における電位 E_0 は1SFBET10の窒化炭素保護膜8とアンモニア選択透過性膜20との界面における電気二重層に基づく界面電位であり、尿素を含む試料液が注入され、酵素固定化膜30による酵素反応によって尿素が分解されてアンモニア基(NH_4^+)が発生する。発生したアンモニア基はアンモニア選択透過性膜20を透過して窒化炭素保護膜8の界面に到達し、界面電位 E_0 を変化させることにより、第2図に示すようにゲート電流は急上がり、約2分後には試料液中の尿素濃度に対応した定常状態に到達する。したがって尿素濃度の異なる試料液を用

いてゲート電位あるいはドレーン電流との相関性をあらかじめ校正しておけば、試料液中の尿素濃度を定量的に測定することができる。

また試料液中に H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 等のカチオンが存在した場合、これらのカチオンはアンモニア選択透過性膜20により1SFBET10の窒化炭素保護膜8の界面に近づくことが阻止されるので、ゲート電位に変化を与えることはなく、したがって参照電極を用いることなくアンモニア以外のカチオンの影響を排除できる尿素測定用酵素センサーを得ることができる。

実施例2

γ-APTESによる表面処理を施した1SFBETの表面に前述の実施例と同様の組成のポリマードープを用いて2回のディップコーティングを行なってアンモニア選択透過性膜を形成し、これにエチレンジアミン0.1mlを80℃で蒸着し、さらにグルタルアルデヒド(GA)0.1mlを80℃で蒸着した。次に、ウレアーゼ20mg、牛血清アルブミン20mgを1mlのpH7.0、0.01Mリン酸緩衝液に溶

持開咭 62-144062 (4)

解した後、GAを0.5%になるように添加し攪拌した。この液に上記の処理を施した1SFESをディップし、5℃で一日乾燥して酵素固定化膜を形成し、これをさらに0.01M Tris-HCl, pH 7.0の緩衝液で8時間洗浄して、尿素測定用の酵素センサーを得た。このセンサーを用いて尿素の定量を行なったところ、10~200mg/dlの範囲で尿素を定量することができた。

【说明与效果】

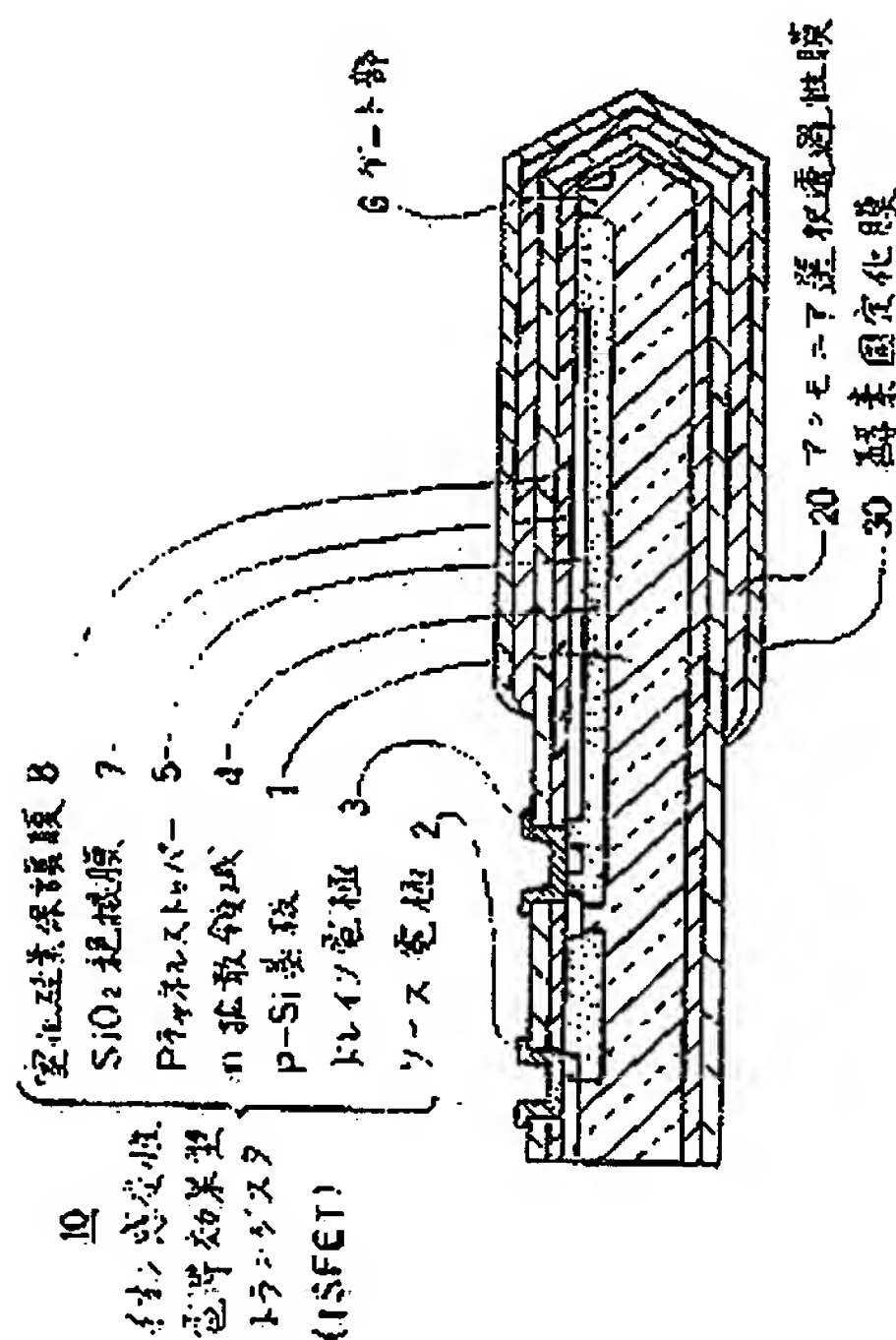
本発明は前述のように、窒化硅素保護膜が形成されたＩＳＦＥＴのゲート部を含む表面にアンモニア選択透過性膜および酵素固定化膜を重層被覆して尿素測定用の酵素センサーを構成した。その結果、従来技術で問題となったアンモニア以外のイオンによってゲート電位が変化することにより測定精度が低下するという問題点がアンモニア選択透過性膜によって排除され、試料液中の尿素を精度よく定量化する尿素測定用の酵素センサーを提供することができる。また、アンモニア選択透過性膜によりアンモニア以外のイオンの影響が排

除されたことにより、従来技術において上記イサ
ンの膨張を打消すために用いられていた巻線電極
を省略することが可能となり、かつ巻線電極の出
力信号を I S F B T の出力信号から差し引くため
の信号処理回路が不要となることにより、感度
測定装置を簡略化することができ、測定操作や校
正作業が簡単で、感度の測定精度の高い感度測定
装置を経済的に有利に提供できる利点が見られる。

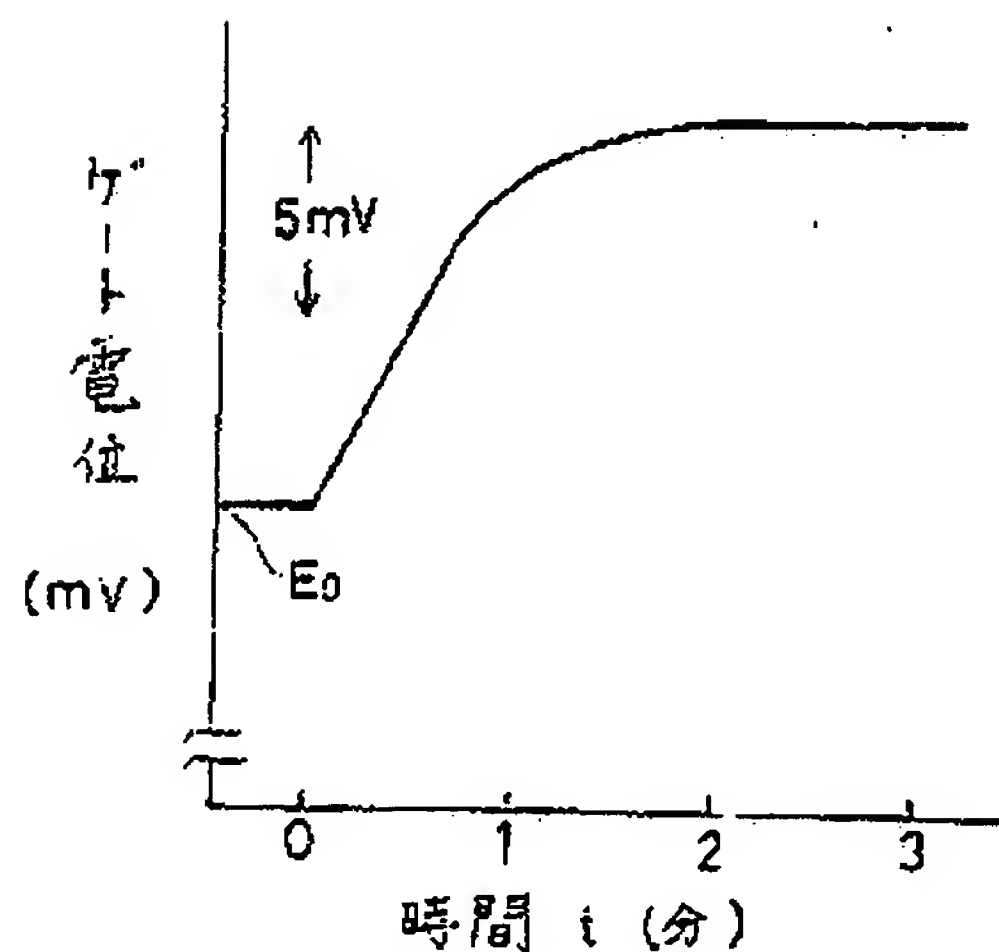
4. 図解の簡単な説明

第1圖は本発明の実施例を示す群集センサーの断面図、第2圖は実施例におけるセンサーの配列を示す位置関係図である。

10: イオン感受性電極効果型トランジスタ (ISFET)、6: ゲート部、7はSiO₂絶縁膜、8: 窒化硅素保護膜、20: アンモニア選択透過性膜、30: 導電固定化膜。



四、一、環



第 2 図